

## تأثیر آگونست گیرنده آدنوزین و اسید اسکوریک بر فراساختار نورون های ناحیه CA1 هیپوکامپ به دنبال ایسکمی-ریپرفیوژن

محمد زمانی<sup>۱</sup>، منصوره سلیمانی<sup>۲</sup>، اکرم علی زاده<sup>۳</sup>، مجید کاتبی<sup>۴</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** در طی ایسکمی مغزی، جریان خون و اکسیژن مغز کاهش می یابد و بعد از برقراری مجدد جریان خون و بازگشت اکسیژن در سلول ها، آسیب های شدیدتر ناشی از تولید و تهاجم رادیکال های آزاد ایجاد می گردد. نظر به این که آسیب هیپوکامپ بعد از ایسکمی-ریپرفیوژن باعث اختلالات زیادی در این عضو می شود، در مطالعه حاضر، تأثیر محافظتی گیرنده A1 (N6-cyclopentyladenosine یا CPA) و اسید اسکوریک بر هیپوکامپ، مورد بررسی قرار گرفت.

**روش ها:** تعداد ۳۵ سر موش سوری نر به صورت تصادفی در ۵ گروه قرار گرفتند. برای القای ایسکمی، شریان های کاروتید مشترک حیوان ۱۵ دقیقه بسته شدند. CPA و اسید اسکوریک روزانه و داخل پریتونوم، اولی به مدت ۷ روز پس از ایسکمی و دومی از دو هفته قبل تا یک هفته بعد از ایسکمی تزریق شدند. در روز ۲۰ پس از القای ایسکمی، مغز موش ها تثبیت، آماده و با میکروسکوپ الکترونی گذاره بررسی شدند.

**یافته ها:** بررسی فراساختار نورون های هیپوکامپ حیوانات با میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM یا Transmission electron microscope) و بر اساس معیارهای موجود، حفظ و بهبودی ارگانل های درون سلولی به ویژه میتوکندری ها را در گروه های درمانی پس از آسیب ایسکمی-ریپرفیوژن نشان داد. در گروه درمان ترکیبی، این حفاظت بیشتر دیده شد.

**نتیجه گیری:** تزریق داخل صفاقی CPA و اسید اسکوریک به دنبال ایسکمی-ریپرفیوژن، موجب کاهش آسیب و تخریب نورون های CA1 هیپوکامپ می شود.

**واژگان کلیدی:** ایسکمی، ناحیه CA1، هیپوکامپ، N6-cyclopentyladenosine، اسید اسکوریک، فراساختار

**ارجاع:** زمانی محمد، سلیمانی منصوره، علی زاده اکرم، کاتبی مجید. تأثیر آگونست گیرنده آدنوزین و اسید اسکوریک بر فراساختار نورون های ناحیه CA1 هیپوکامپ به دنبال ایسکمی-ریپرفیوژن. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۶؛ ۳۵ (۴۳۹): ۸۶۹-۸۶۲

### مقدمه

ایسکمی مغزی، به عنوان یک مسأله ای جدی در پزشکی، ناشی از کاهش جریان خون و ذخیره ای اکسیژن است که باعث مرگ بافت مغزی در اثر تغییر ارتباطات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک ناشی از اختلال جریان خون می شود. این تغییرات، شامل کاهش انرژی و آسیب میتوکندری، اسیدوز ناشی از تولید بی هوازی لاکتات و تورم آستروسیت ها و فشار به عروق مغزی می باشند (۱).

بیشتر انرژی نورون ها صرف حفظ گرادیان یونی در طول غشای سلولی می شود. در دقیقه اول بعد از توقف جریان خون مغزی،

Adenosine triphosphate (ATP) در نورون ها ابتدا به وسیله ی بازسازی می شود. بعد از دو دقیقه، انرژی نورون ها و فعالیت پمپ سدیم-پتاسیم کاهش و پتاسیم به خارج سلول جریان می یابد. آن گاه، یون های سدیم و کلراید به داخل سلول جریان می یابند و غشای سلول دپولاریزه می شود. مقادیر بالای کلسیم داخل سلولی، آنزیم های پروتولیتیک را فعال می کند که پروتئین های سلولی به خصوص پروتئین های اسکلت سلولی را تجزیه می کنند. تجمع کلسیم، آندونوکلتازهای هسته را فعال می کند و موجب شکسته شدن

۱- استادیار، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران

۲- دانشیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی و گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۳- استادیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

۴- دانشیار، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران

Email: majidkatebi@gmail.com

نویسنده مسؤول: مجید کاتبی

جابه‌جایی سدیم و کلسیم و نیز اثر بر روی کانال‌های کلسیم، کلر و پتاسیم اشاره کرد.

همچنین، آدنوزین در ارتباط با سایر هورمون‌ها، در مسیرهای تحریکی و یا مهارتی شرکت می‌کند و نیز فعالیت گیرنده‌ی A1، باعث کاهش و یا افزایش اتصال سایر گیرنده‌ها به پروتئین G می‌شود. آزادسازی درون سلولی آدنوزین، باعث خاتمه‌ی حملات صرعی می‌شود (۷). N6-cyclopentyladenosine (CPA) به عنوان آگونیست اختصاصی برای گیرنده‌ی A1 در موش عمل می‌کند و اغلب مطالعاتی که با استفاده از ایجاد مدل‌هایی در موش صورت می‌گیرد، با استفاده از این دو ماده انجام می‌شود. از CPA در مطالعات هیپوکامپ استفاده‌ی زیادی شده و بهترین آگونیست معرفی شده برای گیرنده‌ی آدنوزین نوع ۱ است (۸).

افزایش میزان نوکلئوتید آدنوزین خارج سلولی بعد از ایسکمی، موضوع مطالعاتی شد که افزایش بیان ژن گیرنده‌ی A1 در حین ایسکمی و کاهش بیان آن ژن در طی رپرفیوژن را نشان دادند. نقش مهارتی گیرنده‌های A1 فعال شده بر روی التهاب و نکروز و آپوپتوز سلول‌های ایسکمیک در کلیه مطالعه شده است. این مطالعات، نقش این گیرنده‌ها بر روی تولید رادیکال‌های آزاد از روی لیپوساکاریدهای تحریک شده‌ی غشای سلولی را نشان دادند (۹).

تأثیر محافظتی ناشی از فعال‌سازی گیرنده‌ی آدنوزین در بیماری‌های مخرب مغزی مانند الزایمر و پارکینسون به اثبات رسیده است. همچنین، گفته شده است که ایسکمی گلوبال مغزی، سبب مرگ نوروں‌های پیرامیدال CA1 هیپوکامپ و کاهش قدرت یادگیری و حافظه فضایی در موش می‌شود. محققین نشان دادند که مدل ایسکمی گلوبال مغزی، موجب نورودژنراسیون وسیع در ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ، استریاتوم و نوکورتکس می‌شود (۱۰).

مطالعات کاهش آپوپتوز سلولی بعد از ایسکمی رپرفیوژن در ناحیه‌ی هیپوکامپ به دنبال بیان ژن گیرنده‌ی A1، کاهش فعالیت کاسپاز ۳ و نیز کاهش میزان پروتئین Bax و افزایش میزان پروتئین Bcl2 در هنگام فعال شدن این گیرنده را به اثبات رساند.

همچنین، آگونیست گیرنده‌ی آدنوزین، می‌تواند مانع مرگ نوروں‌های منطقه‌ی ایسکمیک قشر مغز گردد و اثر پیش‌گیرانه‌ای در برابر ایسکمی مغزی از خود نشان می‌دهد (۱۱). فیزیولوژی گیرنده‌های A1 به طور وسیعی در مغز بررسی شده و مکانیسم‌های مربوط به فعالیت این دو گیرنده و آگونیست‌ها و آنتاگونیست‌های مختلف آن‌ها مورد آزمایش قرار گرفته است و در نهایت، بر نقش حفاظتی آن‌ها در آسیب‌ها و استرس‌های اکسیداتیو به خصوص ایسکمی تأکید شده است (۱۲). نقش سمیت‌زدایی ویتامین C در ارتباط با رادیکال‌های آزاد، از مدت‌ها قبل مورد توجه بوده است.

کروماتین‌ها و شروع روند آپوپتوز می‌شود. همچنین، آنزیم‌های فسفولیپاز را فعال می‌کند که به فسفولیپیدهای غشای سلولی حمله و موجب انتشار اسید آرشیدونیک می‌شود (۲).

اسید آرشیدونیک، برای پایداری غشای سلولی ضروری است. آزاد شدن آن نقش مهمی در تشدید آسیب‌های ایسکمی - رپرفیوژن دارد. اسید آرشیدونیک، اثر مستقیم بر میتوکندری دارد و علاوه بر مهار مستقیم آنزیم‌های تنفسی، موجب تشکیل رادیکال‌های آزاد می‌شود. آنزیم بزرگ لاکتات دهیدروژناز (Lactate dehydrogenase یا LDH) از غشای آسیب دیده نشت می‌کند. LDH بافتی یا خونی، القا کننده‌ی مرگ سلولی در طول ایسکمی - رپرفیوژن است (۳). آسیب ناشی از رپرفیوژن، به مراتب بیشتر است؛ به این ترتیب که در طول دوره‌ی ایسکمی، تجمع اسید لاکتیک موجب کاهش pH سلولی می‌شود که به دنبال رپرفیوژن افزایش می‌یابد.

به محض رپرفیوژن، کلسیم وارد میتوکندری می‌شود، اما منافذ نفوذپذیری گذرا، به خاطر اسیدیته‌ی پایین بسته باقی می‌ماند. افزایش pH در نتیجه‌ی رپرفیوژن، می‌تواند آن‌ها را باز کند. اگر این منافذ بسته بمانند یا ATP بتواند آن‌ها را ببندد، سلول‌هایی ایجاد می‌شود که با آپوپتوز می‌میرند، اما بدون ATP کافی، باز بودن آن‌ها، موجب نکروز می‌شود. Nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen (NADH) اکسیداز، در رپرفیوژن با اکسیژن تازه واکنش می‌دهد و سوپر اکسید تولید می‌کند. سوپر اکسید با Proteins iron-sulfur واکنش می‌دهد و موجب کاهش فعالیت آن‌ها می‌شود و باعث تشکیل رادیکال هیدروکسیل می‌شود. سوپر اکسید با نیتریک اکسید واکنش می‌دهد و رادیکال آزاد پروکسی نیتريت تشکیل می‌دهد.

هیپوکامپ، یک ناحیه‌ی کلیدی مغز است که در حافظه و یادگیری نقش دارد و همچنین، نقش مهمی در تشکیل حافظه‌ی جدید و تجزیه و تحلیل اطلاعات فضایی ایفا می‌کند (۴). هیپوکامپ، شامل نواحی CA1، CA2، CA3 و CA4 است. ناحیه‌ی CA1 در مجاورت سوبیکولوم و ناحیه‌ی CA3 در مجاورت فیمبریا، فورنیکس و شبکه‌ی کوروییدی قرار دارد. همچنین، ناحیه‌ی CA2 بخش کوچکی بین CA1 و CA3 می‌باشد و ناحیه‌ی CA4 نیز در ناف دنتیت گیروس قرار گرفته است. سلول‌های پیرامیدال ساختاری هرمی دارند (۵). بخش عمده‌ی الیاف آوران به هیپوکامپ از لایه‌های ۲ و ۳ قشر انترینال می‌آید که از طریق الیاف پرفورانت به آن می‌رسد. هیپوکامپ و قشر انترینال، مرکز اصلی حافظه در مغز هستند (۶). گیرنده‌ی A1 از خانواده‌ی گیرنده‌های پورینرژیک است که توزیع گسترده‌ای در سراسر بدن حیوانات دارد. این گیرنده‌های گلیکوپروتئینی فعالیت‌های مختلفی را بر روی سلول انجام می‌دهند که از آن جمله، می‌توان به فعال کردن آدنوزین سیکلاز، فسفولیپاز C،

اولین مطالعات نشان داد که این ماده، آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد را تعدیل می‌کند و به حداقل می‌رساند. نقش آنتی‌اکسیدان‌ها به خصوص ویتامین C در حذف رادیکال‌های آزاد در سیستم عصبی رت‌های مبتلا به دیابت نیز به اثبات رسیده است. نشان داده شده است که ویتامین C در هنگام التهاب مغزی، به کندی قابل عبور از سد خونی-مغزی است (۱۴-۱۳). بیوسنتز اسید اسکوربیک یا ویتامین C از گلوکز و گالاکتوز و یا مشتقات آن‌ها صورت می‌گیرد. این ویتامین در بدن انسان، به دلیل فقدان آنزیم L-گلونولاکتون اکسیداز، ساخته نمی‌شود (۱۵). بدن انسان، روزانه به ۷۵ میلی‌گرم ویتامین C نیاز دارد. افزایش آن بیش از این مقدار، باعث دفع از طریق ادرار می‌شود. رژیم غذایی مناسب، می‌تواند ذخیره‌ی مناسبی از آن را برای شرایط بحرانی در کبد فراهم آورد (۱۶).

با توجه به اهمیت صدمات نورون‌های هیپوکامپ پس از ایسکمی-ریپرفیوژن، در این مطالعه به بررسی اثر تجویز هم‌زمان آگونست گیرنده‌ی A1 و اسید اسکوربیک بر فراساختار نورون‌های آن پرداخته شده است.

### روش‌ها

**مدل بیولوژیک:** ۳۵ سر موش سوری نر نژاد Bulb-c با وزن ۳۵-۴۵ گرم تحت شرایط استاندارد با دوره‌ی روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته و دمای  $21 \pm 3$  درجه‌ی سانتی‌گراد با دسترسی کامل به آب آشامیدنی و غذای کافی مورد مطالعه قرار گرفتند.

**گروه‌بندی حیوانات:** حیوانات از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی ایران تهیه و به صورت تصادفی در ۵ گروه قرار گرفتند.

**گروه شاهد:** ۷ سر موش

**گروه ایسکمی:** ۷ سر موش که تحت القای ایسکمی قرار گرفتند.

**گروه Experimental:** ۲۱ موش که به طور تصادفی در ۳ زیر گروه قرار می‌گیرد:

A: گروه Pre treatment که از دو هفته قبل تا یک هفته بعد از ایسکمی به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت روزانه اسید اسکوربیک دریافت کردند ( $n = 7$ )

B: گروه Post treatment که ۱ میلی‌گرم/کیلوگرم آگونست گیرنده‌ی A1 را از روز هفتم بعد از ایسکمی به مدت ۷ روز دریافت کردند ( $n = 7$ ).

C: گروه Pre & post treatment که علاوه بر اسید اسکوربیک قبل و بعد از ایسکمی، آگونست گیرنده‌ی A1 را هم بعد از ایسکمی دریافت کردند ( $n = 7$ ).

**ایجاد مدل ایسکمی:** با استفاده از کتامین (Ketamine) ۱۰۰ میلی‌گرم و گزیلازین (Xylazine) ۱۰ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم وزن، حیوانات بیهوش و روی میز ثابت شدند. تحت شرایط استریل، قسمت قدامی گردن تراشیده و برشی ۱/۵ سانتی‌متری داده شد، شریان کاروتید مشترک دو طرف با کلمپ‌های شریانی برای ۱۵ دقیقه بسته شدند. سپس، جریان خون برقرار شد. دمای بدن حیوان بین ۲۴-۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد حفظ شد (۱۷).

**ثبیت (Fixation) به روش پرفیوژن:** حیوان با دز بالای کتامین (۱۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و گزیلازین (۱۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) به طور عمیق بیهوش شد. با برش میانی جدار قدامی شکم، دیافراگم و کناره‌ی خارجی دنده‌ها، قلب دارای ضربان نمایان شد. کاتتر مخصوص پرفیوژن وارد بطن چپ گردید و پس از آن، برشی در دهلیز راست برای خروج خون ایجاد شد. آنورت نزولی با پنس کلامپ شد. ابتدا، ۷۵-۵۰ سی‌سی نرمال‌سالین برای خارج کردن خون در مدت ۱۰-۵ دقیقه و سپس، ۱۰۰-۷۵ سی‌سی پارافرمالدئید ۴ درصد در محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار با  $pH = 7.4$ ، در مدت ۱۵-۱۰ دقیقه از رگ‌ها عبور داده شد. پس از پایان پرفیوژن، مغز با دقت خارج و در محلول Karnovsky's (ترکیب پارافرمالدئید و گلتارالدئید) قرار داده شد.

**میکروسکوپ الکترونی (مطالعه‌ی فراساختاری):** پس از پرفیوژن، هیپوکامپ برای مطالعات فراساختاری جدا شد و به محلول Karnovsky's منتقل گردید و ۲ ساعت در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس، مراحل طبق جدول ۱ انجام شد. سپس، نمونه‌ها قالب‌گیری و برای پلیمریزه شدن رزین به مدت ۲۴ ساعت در Oven ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

**تهیه‌ی برش‌های نیمه نازک (Semi thin):** با استفاده از اولترا میکروتوم (Leica, Ultracut)، برش‌های ۵۰۰ نانومتری تهیه گردید. برش‌ها روی لام تمیز منتقل و خشک شدند. سپس، توسط چند قطره رنگ تولوئیدین بلو ۱ درصد به مدت ۵ دقیقه رنگ شدند. بعد از شستشو با آب مقطر و خشک شدن، لامل چسبانده و با میکروسکوپ نوری مطالعه شد تا محل مناسب برای برش‌های فوق نازک مشخص گردد.

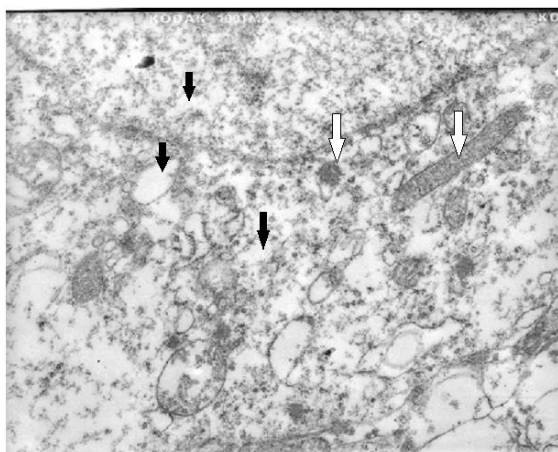
**تهیه‌ی برش‌های فوق نازک (Ultrathin):** بعد از تعیین محل مناسب برش‌ها، توسط اولترا میکروتوم، برش‌های ۷۰-۵۰ نانومتری تهیه گردید. برش‌ها به گریدهای ۲۰۰ مش منتقل و پس از خشک شدن به صورت زیر رنگ‌آمیزی شدند:

- رنگ‌آمیزی با اورانیل استات اشباع شده در اتانول ۵۰ درجه به مدت ۱۵ دقیقه
- سه بار شستشو در آب مقطر

جدول ۱. مراحل تهیه‌ی بلوک برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی

ترتیب انجام کار	نام مرحله	مدت زمان	تعداد تکرار
۱	شستشو با بافر فسفات سالین ۰/۱ مولار	۱۵ دقیقه	۲ بار
۲	تتراکسید اسمیوم ۱٪	۱/۵ ساعت	۱ بار
۳	شستشو با بافر فسفات سالین ۰/۱ مولار	۱۵ دقیقه	۲ بار
۴	آب گیری با استون ۵۰٪	۱۵ دقیقه	۱ بار
۵	آب گیری با استون ۷۰٪	۱۵ دقیقه	۱ بار
۶	آب گیری با استون ۹۰٪	۱۵ دقیقه	۱ بار
۷	آب گیری با استون ۱۰۰٪	۳۰ دقیقه	۲ بار
۸	ترکیب استون ۱-رزین	۱ ساعت	۱ بار
۹	ترکیب استون ۱-رزین ۲	۲ ساعت	۱ بار
۱۰	ترکیب استون ۱-رزین ۲	تمام شب	۱ بار
۱۱	رزین کامل	۲ ساعت	۱ بار
۱۲	رزین کامل	۴ ساعت	۱ بار

تحقیقات (۱۸)، بررسی و نتایج ارایه شده‌اند (جدول ۲).



شکل ۱. فتوگراف از فراساختار سلولی نورون ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ گروه ایسکمی (۵۲۱۳ X). هسته در بالا و سایر اندامک‌ها در پایین دیده می‌شود. واکوئلیزاسیون در هسته و سیتوپلاسم (پیکان تیره) و تخریب شدید میتوکندری‌ها (پیکان سفید) دیده می‌شود.

- خشک شدن در هوای اتاق
- رنگ آمیزی با سیترات سرب به مدت ۲۰ دقیقه
- سه بار شستشو در آب مقطر
- خشک شدن در هوای اتاق

#### مطالعه با میکروسکوپ الکترونی-گذاره

(Transmission electron microscope یا TEM): گریدهای

تهیه شده توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره (Ziess, EM 900) دانشگاه علوم پزشکی ایران مطالعه گردید.

#### یافته‌ها

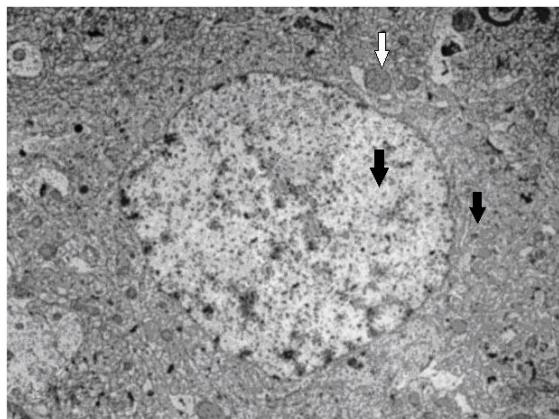
مطالعات نشان داده‌اند که یکپارچگی و نظم غشای هسته و تراکم ارگانل‌های اطراف آن و نیز توزیع کروماتین در هنگام بروز ایسکمی، با حالت طبیعی متفاوت است. در ایسکمی، غشای هسته ملتهب می‌شود و توزیع کروماتین به هم می‌ریزد و ارگانل‌ها از اطراف هسته دور می‌شوند و به ویژه میتوکندری آسیب می‌بیند (شکل ۱). در مطالعه‌ی حاضر، به ویژه تغییرات میتوکندری بر اساس معیارهای مورد استفاده در سایر

جدول ۲. تغییرات فراساختار میتوکندری‌ها به دنبال ایسکمی-ریپرفیوژن و درمان با ویتامین C و N6-cyclopentyladenosine (CPA)

گروه‌ها	نظم کریستالها	فضای بین کریستالها	تراکم ماتریکس
شاهد	طبیعی	طبیعی	طبیعی
ایسکمی	پارگی +++	اتساع +++	فقدان +++
درمان با ویتامین C	پارگی ++	اتساع +	فقدان ++
درمان با CPA	پارگی ++	اتساع +	فقدان +
درمان با ویتامین C و CPA	پارگی +	اتساع -	فقدان +

CPA: N6-cyclopentyladenosine

خفیف: +، متوسط: ++، شدید: +++



شکل ۳. فتوگراف از فراساختار سلولی نورون ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ گروه شاهد (۵۰۰۰ X). هسته در مرکز و سایر ارگانل‌ها در اطراف آن قرار دارند. غشای هسته و توزیع ارگانل‌های سلولی حالت طبیعی دارند و واکونلیزاسیونی در هسته و سیتوپلاسم دیده نمی‌شود و توزیع کروماتین در هسته طبیعی است (پیکان تیره). میتوکندری‌ها طبیعی و سالم هستند (پیکان سفید).

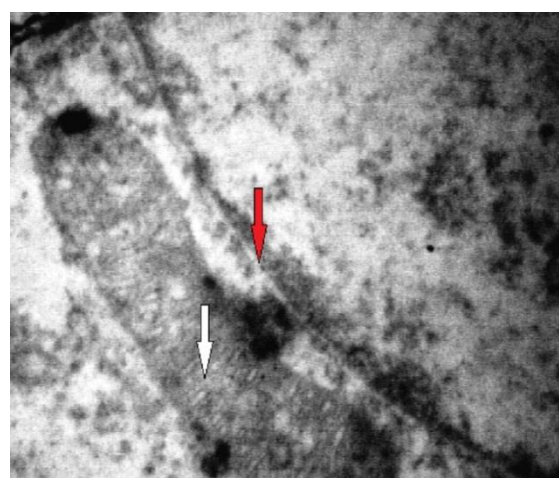
اثبات شده است که میتوکندری‌ها، از حساس‌ترین ارگانل‌های سلول هستند که در آسیب‌های سلولی نظیر ایسکمی، نظم کریستاهای آن‌ها از بین می‌رود و تخریب می‌شوند (۱۹). بنابراین، در مطالعه‌ی حاضر، بررسی دقیق میتوکندری‌ها در کنار وضعیت هسته صورت گرفت.

در این مطالعه، با تزریق اسکوربیک اسید قبل از القای ایسکمی، نقش پیش‌گیرانه‌ی آن در ایجاد تغییرات ناشی از ایسکمی بررسی شده است. در مطالعه‌ی نقش این ویتامین در حفاظت از نورون‌های هیپوکامپ موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت در هنگام ایسکمی به اثبات رسید. دانشمندان، مکانیسم غالب در مورد این عملکرد را به خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن نسبت می‌دهند (۲۰). در مطالعه‌ی، این ویتامین از کاهش تعداد نورون‌های هیپوکامپ به دنبال ایسکمی جلوگیری کرد (۲۱). حفظ یکپارچگی غشای سلولی و ممانعت از آسیب به هسته و سایر ارگانل‌های حساس سلولی، به خصوص میتوکندری‌ها را از اثرات آنتی‌اکسیدانی این ویتامین بر شمرده‌اند (۲۲).

در یک تحقیق دیگر، نقش CPA در حفاظت از نورون‌های مغز موش‌های صحرایی تازه متولد شده به اثبات رسید و بیان شد که این ماده، مانع فعال شدن کاسپاز ۳ و نیز مانع آزاد شدن سیتوکروم C از میتوکندری‌ها می‌شود و فرصت ترمیم سلولی را افزایش می‌دهد (۲۳). در مطالعات گذشته، اثر این ماده در جلوگیری از مرگ سلول‌ها در حالت هیپوکسی در قشر مغز نیز به اثبات رسیده بود (۲۴) و نیز بیان شده بود که CPA دارای نقش آنتی‌اکسیدانی خفیفی نیز هست (۲۵).

در مجموع، مکانیسم‌های احتمالی نقش این گیرنده را در غیر

نتایج بررسی و مقایسه‌ی فراساختار نورون‌های هیپوکامپ در گروه شاهد و گروه ایسکمی - ریپرفیوژن نشان می‌دهد که به دنبال این رویداد، تغییرات نکروتیک و آپوپتوتیک در هسته و سیتوپلاسم (میتوکندری) رخ می‌دهد (شکل ۱). این بررسی، نشان می‌دهد که در گروه درمان با ویتامین C، پارگی کریستاهای میتوکندری کمتر بود و فضای بین کریستاهای متسع کمتری را نشان می‌داد. در گروه درمانی با CPA، هم اتساع بین کریستاهای میتوکندری کمتر بود و هم تراکم ماتریکس طبیعی‌تر بود. در گروه ترکیبی (شکل ۲)، نظم کریستاهای فضای بین کریستاهای ماتریکس به گروه شاهد نزدیک‌تر دیده شد (شکل ۳).



شکل ۲. فتوگراف از فراساختار سلولی نورون ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ گروه درمان ترکیبی (۱۲۹۳۰ X). هسته در بالا و میتوکندری در پایین قرار دارد. غشای هسته یکپارچگی دارد و التهابی دیده نمی‌شود (فلش تیره). میتوکندری با کریستاهای منظم دیده می‌شود که نشان دهنده‌ی به حداقل رسیدن تأثیر ایسکمی بر روی این ساختارها با مصرف هم‌زمان ویتامین C و N6-cyclopentyladenosine (CPA) است (پیکان قرمز غشای هسته و پیکان سفید کریستاهای میتوکندری را نشان می‌دهند).

## بحث

هیپوکامپ، یک ناحیه‌ی کلیدی در مغز است و آسیب آن پس از ایسکمی - ریپرفیوژن اختلال زیادی در عملکرد آن ایجاد می‌کند. بررسی و تحقیق در مورد چگونگی محافظت و کاهش دادن صدمه به هیپوکامپ پس از ایسکمی - ریپرفیوژن اهمیت زیادی دارد. در این مطالعه، از میان مدل‌های حیوانی موجود برای مطالعه‌ی ایسکمی - ریپرفیوژن، مدل انسداد شریان‌های کاروتید مشترک استفاده شد. بستن هر دو کاروتید مشترک (Contralateral carotid artery occlusion یا CCO) به مدت ۱۵ دقیقه، موجب آسیب سلولی گسترده در ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ می‌شود.



جلوگیری کند و به دنبال آن، مانع از مرگ نورون‌های آسیب دیده شود. هر دوی این مکانیسم‌ها، در واقع با حفظ فراساختار سلول‌های ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ، می‌تواند باعث حفظ نورون‌های زیادی از مرگ و حفظ عملکرد این ناحیه از مغز می‌شود.

نتیجه‌گیری نهایی این که استفاده‌ی هم‌زمان از آکونیست گیرنده‌ی A1 و اسکوربیک اسید، می‌تواند باعث کاهش آسیب و تغییرات فراساختاری در نورون‌ها به ویژه میتوکندری آن‌ها در هنگام ایسکمی در ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ شود.

### تشکر و قدردانی

این مطالعه، با حمایت مالی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران و در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی آن دانشگاه انجام شده است. بدین وسیله، از همکاری صمیمانه‌ی همه‌ی همکاران آن مراکز تقدیر و تشکر می‌شود.

فعال کردن کاسپاز ۳ و ممانعت از ورود سیتوکروم C از فضای بین دو غشای میتوکندری به درون سیتوپلاسم و جلوگیری از شروع واکنش آبشاری کاسپازها هم از مسیر برون سلولی با استفاده از گیرنده‌های مرگ و هم از طرق مسیر درون سلولی وابسته به سیتوکروم C و میتوکندری می‌دانند (۲۶).

در این مطالعه، به بررسی تأثیر استفاده‌ی هم‌زمان از هر دو عامل بر فراساختار نورون‌های هیپوکامپ پرداخته شد. با توجه به نتایج به دست آمده، انتظار می‌رفت آسیب نورونی به دنبال ایسکمی در گروه درمان ترکیبی با CPA و ویتامین C کاهش قابل توجهی داشته باشد که با نتایج به دست آمده، هم‌خوانی داشت. با توجه به مطالعات انجام گرفته در مورد مکانیسم‌های این مواد و با توجه به یافته‌های این مطالعه، به نظر می‌رسد که تجمع خواص آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌آپوپتوتیکی که درباره‌ی این دو ماده به اثبات رسیده است، در هنگام بروز ایسکمی می‌تواند از آسیب دیدگی نورون‌های زیادی

### References

1. Lee JM, Grabb MC, Zipfel GJ, Choi DW. Brain tissue responses to ischemia. *J Clin Invest* 2000; 106(6): 723-31.
2. Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH. A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide. *Ann Neurol* 1992; 32(3): 297-311.
3. Camarata PJ, Heros RC, Latchaw RE. "Brain attack": the rationale for treating stroke as a medical emergency. *Neurosurgery* 1994; 34(1): 144-57.
4. Eichenbaum H. Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron* 2004; 44(1): 109-20.
5. Buttner-Ennever J. The rat brain in stereotaxic coordinates. *J Anat* 1997; 191(Pt 2): 315-7.
6. Taupin P. The hippocampus: Neurotransmission and plasticity in the nervous System. New York, NY: Nova Biomedical Books; 2008.
7. Vollert C, Forkuo GS, Bond RA, Eriksen JL. Chronic treatment with DCPCX, an adenosine A(1) antagonist, worsens long-term memory. *Neurosci Lett* 2013; 548: 296-300.
8. Johansson B, Halldner L, Dunwiddie TV, Masino SA, Poelchen W, Gimenez-Llort L, et al. Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(16): 9407-12.
9. Modlinger PS, Welch WJ. Adenosine A1 receptor antagonists and the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003; 12(5): 497-502.
10. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Ischemia/Reperfusion. *Compr Physiol* 2016; 7(1): 113-70.
11. Sai K, Yang D, Yamamoto H, Fujikawa H, Yamamoto S, Nagata T, et al. A(1) adenosine receptor signal and AMPK involving caspase-9/-3 activation are responsible for adenosine-induced RCR-1 astrocytoma cell death. *Neurotoxicology* 2006; 27(4): 458-67.
12. Zamani M, Soleimani M, Golab F, Mohammadzadeh F, Mehdizadeh M, Katebi M. NeuroProtective effects of adenosine receptor agonist coadministration with ascorbic acid on CA1 hippocampus in a mouse model of ischemia reperfusion injury. *Metab Brain Dis* 2013; 28(3): 367-74.
13. Wilson MK, Baguley BC, Wall C, Jameson MB, Findlay MP. Review of high-dose intravenous vitamin C as an anticancer agent. *Asia Pac J Clin Oncol* 2014; 10(1): 22-37.
14. Hossein Hassanshahi G, Hassanshahi J, Zamani M, Hakimzadeh E, Soleimani M. Comparison of therapeutic effects of vitamin c and coq10 in reducing of damaged cells in mice hippocampus following ischemia-reperfusion. *J Mazandaran Univ Med Sci*. 2012; 22 (94): 2-13. [In Persian].
15. Melani A, Pugliese AM, Pedata F. Adenosine receptors in cerebral ischemia. *Int Rev Neurobiol* 2014; 119: 309-48.
16. Shugalei I. Features of vitamin C metabolism and the functional status of the liver in alcoholism and alcoholic delirium in the stage of detoxification therapy. *Zh Nevropatol Psikhiatr Im S S Korsakova* 1987; 87(2): 240-3. [In Russian].
17. Stafford A. Potentiation of adenosine and the adenine nucleotides by dipyrindamole. *Br J Pharmacol Chemother* 1966; 28(2): 218-27.
18. Zarch AV, Toroudi HP, Soleimani M, Bakhtiarian A, Katebi M, Djahanguiri B. Neuroprotective effects of diazoxide and its antagonism by glibenclamide in pyramidal neurons of rat hippocampus subjected to ischemia-reperfusion-induced injury. *Int J Neurosci* 2009; 119(9): 1346-61.

19. Schmidt W, Reymann KG. Proliferating cells differentiate into neurons in the hippocampal CA1 region of gerbils after global cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 2002; 334(3): 153-6.
20. Niwano Y, Saito K, Yoshizaki F, Kohno M, Ozawa T. Extensive screening for herbal extracts with potent antioxidant properties. *J Clin Biochem Nutr* 2011; 48(1): 78-84.
21. Miura S, Ishida-Nakajima W, Ishida A, Kawamura M, Ohmura A, Oguma R, et al. Ascorbic acid protects the newborn rat brain from hypoxic-ischemia. *Brain Dev* 2009; 31(4): 307-17.
22. Frei B, England L, Ames BN. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86(16): 6377-81.
23. Cotter MA, Love A, Watt MJ, Cameron NE, Dines KC. Effects of natural free radical scavengers on peripheral nerve and neurovascular function in diabetic rats. *Diabetologia* 1995; 38(11): 1285-94.
24. O'Neill MJ, Hicks CA, Ward MA, Osborne DJ, Wishart G, Mathews KS, et al. LY393615, a novel neuronal Ca(2+) and Na(+) channel blocker with neuroprotective effects in models of in vitro and in vivo cerebral ischemia. *Brain Res* 2001; 888(1): 138-49.
25. Joshi VK, Sharma SK. Comparative fermentation behaviour, physico-chemical and sensory characteristics of plum wine as effected by type of preservative. *Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel* 1995; 17(3-4): 65-73.
26. Zamani M, Katebi M, Mehdizadeh M, Kafami L, Soleimani M. Combination therapy with A1 receptor agonist and vitamin C improved working memory in a mouse model of global ischemia-reperfusion. *Basic Clin Neurosci* 2013; 4(2): 111-6.

## Effect of Adenosine Receptor Agonist and Ascorbic Acid on Ultrastructure of Hippocampal CA1 Neurons after Ischemia-Reperfusion Injury

Mohammad Zamani<sup>1</sup>, Mansoureh Soleimani<sup>2</sup>, Akram Alizadeh<sup>3</sup>, Majid Katebi<sup>4</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** In brain ischemia, blood and oxygen supply decrease and after reperfusion, free radicals and reactive oxygen species (ROS) cause severe damage. As hippocampal injury after ischemia-reperfusion causes some complications, in this study we analyzed the effect of adenosine receptor agonist (N6-cyclopentyladenosine or CPA) and ascorbic acid on ultrastructure of hippocampal CA1 neurons after ischemia-reperfusion.

**Methods:** 35 male rats in 5 groups were used. Ischemia-reperfusion performed by occlusion of common carotids for 15 minutes. CPA and ascorbic acids were intraperitoneally injected for 7 days after ischemia, and 2 weeks before and for 7 days after ischemia, respectively. After 20 days, brain samples were isolated, prepared, and assayed using transmission electron microscopy (TEM).

**Findings:** Ultrastructure assay of hippocampal CA1 neurons after ischemia-reperfusion with transmission electron microscopy showed recovery of intracellular organelles particularly mitochondria of treated groups. In combination therapy, these improvements were better.

**Conclusion:** Intraperitoneal injection of CPA and ascorbic acid after ischemia-reperfusion can reduce neural damage in CA1 region of hippocampus.

**Keywords:** Ischemia, CA1 region, Hippocampal, N6-cyclopentyladenosine, Ascorbic acid, Ultrastructure

**Citation:** Zamani M, Soleimani M, Alizadeh A, Katebi M. **Effect of Adenosine Receptor Agonist and Ascorbic Acid on Ultrastructure of Hippocampal CA1 Neurons after Ischemia-Reperfusion Injury.** J Isfahan Med Sch 2017; 35(439): 862-9.

1- Assistant Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran

2- Associate Professor, Cellular and Molecular Research Center AND Department of Anatomy, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

4- Associate Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran

**Corresponding Author:** Majid Katebi, Email: majidkatebi@gmail.com